

Streptomyces sp.409 에서 분리한 항암활성 물질의 특징

장 영 수

한국회귀의약품센터

(Received September 1, 2000)

The Characteristics of Antitumor Agent Isolated from *Streptomyces* sp.409

Young Soo Chang

Korea Orphan Drug Center

Abstract – This study was carried out to find new anti-tumor agent producing microbe and to characterize the anti-tumor agent produced from the microbe. Purified compound that has a high cytotoxicity against tumor cell-lines could be obtained from the broth culture filtrates of *Streptomyces* sp.409 strain isolated from soil in Korea. The *in vitro* cytotoxicity, the *in vivo* evaluation of acute toxicity, the safety assessment of the anti-tumor compounds and the taxonomic characteristics of the anti-tumor agent were measured. The anti-tumor compound 1 and 2 were obtained from the broth culture filtrates of *Streptomyces* sp.409 strain. The cytotoxicity of the compound 1 against tumor cell-line P388D₁ showed almost 4.5 times higher than that of adriamycin. However, in the cytotoxicity against normal cell line Vero E6, adriamycin showed adversely 4 times higher than the compound 1 (IC₅₀ value : 228.7 µg/ml). In comparison study with compound 1 and compound 2 in the *in vitro* cytotoxin productivity against tumor cell lines, IC₅₀ value of the compound 1 was 0.25 µg/ml in tumor cell line P388D₁ and 0.53 µg/ml in tumor cell-line L1210, and that of the compound 2 was 7.18 µg/ml and 35.71 µg/ml, respectively. LD₅₀ value of the compound 1 in the *in vivo* acute toxicity in mice was 22.62 mg/kg body weight. These results suggest that compound 1 purified from *Streptomyces* sp. 409 has anti-tumor activity and will be developed as an anti-tumor drug.

Keywords □ Anti-tumor agent, *Streptomyces* sp.409 strain, cytotoxicity.

토양에서 분리된 방선균(streptomyces)은 그 대사 과정에서 매우 효과적인 다양한 종양 세포 억제 인자를 생산하는 것으로 보고되었고^{1,2)} 실제 sarkomycin이 1953년 일본에서 토양 방선균의 배양액에서 분리된 이후 daunorubicin, actinomycin D 등 여러 화합물들이 방선균의 배양 여액에서 분리되었고 독성 및 임상 실험을 거쳐 각종 종양 치료에 이용되고 있다.³⁾

그러나 *Streptomyces antibioticum* 으로부터 분리된 actinomycin D는 임파육아종에 우수한 효과를 나타내

지만 너무 독성이 강하여 널리 사용되지 못하고 있으며, *Streptomyces griseus*에서 분리된 bleomycin은 피부암, 두경부암 그리고 편평상피암에 우수한 치료 효과를 보이나 폐에 독성이 있다. 또한 현재 가장 광범위하게 사용되는 doxorubicin(adriamycin)은 심근계 및 순환계에 심각한 부작용을 나타낸다는 보고가 있었다. 따라서 기존의 항암 화합물보다 부작용이 낮고 또한 암세포에 대한 선택적 독성능이 높은 새로운 천연 화합물의 꾸준한 탐색과 개발이 요구된다. 본 연구는 기존의 항암제보다 세포독성능이 우수하고 낮은 부작용을 보이는 항종양물질을 생산하는 분리균주를 동정하였으며 항종양능을 보이는 물질을 배양여액으로부터 분리 정제하였다.

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-508-7316-8 (팩스) 02-508-7319

실험방법

방선균의 동정

균의 일반적 특성 - 분리균주를 YEME(yeast extract-malt extract) 배지에 도말하여 28°C에서 14일간 배양한 후 8% glutaraldehyde 용액으로 1일간 고정시키고 포자 형성이 잘된 부분을 채취하여 P₂O₅가 들어있는 밀폐 용기에 넣어 -20°C에서 3일간 건조하고 gold coating하여 Scanning Electron Microscope로 포자의 사슬을 관찰하였다.⁴⁾ 균의 증식은 분리균주를 ISP 배지,^{5,6)} Benett 평판 배지, Czapek Dox agar 그리고 dextrose agar에 배양하여 21일 동안 7일 간격으로 증식 정도 기균사의 색깔 및 가용성 색소 등 제반을 관찰하였다. 균의 생물학적 및 생화학적 특성을 규명하기 위해 세포벽의 DAP (Diaminopimelic acid) 분석과⁷⁻¹²⁾ 균체내 당⁷⁾ 및 인지질^{16,17)}을 분석하였으며 지방산은 gas chromatography로 분석하였다.

분리균주의 동정 - 시험에 사용한 균주의 종을 확인하기 위하여 영국의 Dr. Ward와 Dr. Geedfellow에¹³⁾ 의해 개발된 Taxon program을 이용하였다.¹⁴⁾ 형태 및 색소형성 시험,^{5,6)} 항균력 시험(시험균주 : *Bacillus subtilis*(ATCC 11778), *Micrococcus luteus*(ATCC 9341), *Candida albicans*(ATCC 10231), *Sacchromyces cerevisiae*, *Streptomyces muinus* ISP 5091, *Aspergillus niger* (ATCC 32656)) 생화학적 시험 : Lecithinase 생성 및 lipolysis 시험,¹⁵⁾ Pectin 가수분해능력 시험,¹⁶⁾ 질산염 환원 및 황화수소(H₂S) 생성 시험¹⁷⁾ 및 Hippurate 가수분해 능력시험을 통하여 분리균주를 동정하였다. 한편 Elastin(0.3% w/v)과 Xanthine(0.4% w/v)을 이용한 분해능 시험 및 항생물질 내성 시험을 시행하였다.¹⁸⁾

화학적 저해물에 대한 증식 특성은 sodium azide (0.001% w/v), NaCl(7% w/v), phenol(0.1% w/v), potassium tellurite(0.001% w/v), thallos acetate (0.001% w/v)를 사용하였으며, 아미노산과 당 이용능력도 관찰하였다.

항종양 물질의 분리 정제 - 분리균주 409의 배양액으로부터 항종양물질의 분리 및 정제 과정을 Fig. 1에 표기하였다. 분리균주를 대량 배양한후 ethyl acetate로 추출하고 회전진공증발기(rotary evaporator)를 이용하여 65°C에서 vacuum pump를 이용해서 ethyl acetate를 제거하여 crude extract를 얻었으며 -10°C 냉동고에 보관하면서 thin layer chromatography

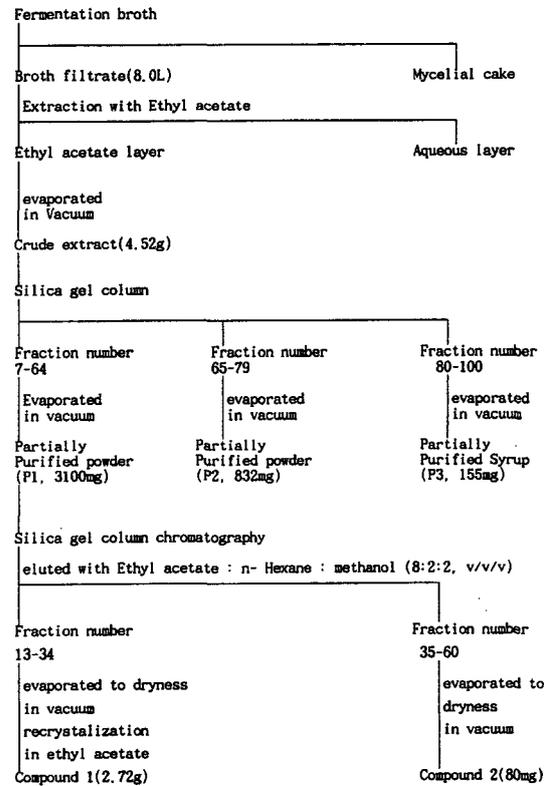


Fig. 1 - Scheme of isolation and purification of compounds from *Streptomyces* sp. 409.

(TLC)를 통해서 항종양물질을 정제하였다. TLC 결과를 토대로 chloroform에 녹인 crude extract를 silicagel (230~400 mesh)로 채워진 column chromatography를 이용하여 부분 정제된 세 분획으로 분리하였다. 이 분획들에 대한 *in vitro* 세포 독성능 측정 결과, 암세포주에 대해 우수한 독성능을 보이는 한 분획을 선정하여 전개용매를 달리하여 재차 chromatography를 실시하였고 이로부터 최종적으로 순도 높은 두 가지 분획으로 분리할 수 있었다. 실험을 통해 얻은 분획은 모두 즉시 회전 진공 증발기를 이용하여 유기 용매를 제거하고 분말화시켰으며 얻은 분획은 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

세포주와 배양 - 본 실험에 사용된 세포주 중 정상 세포인 Vero는 한국 세포주 은행에서 분양받아 사용하였고, 암세포주인 P388D₁, L1210는 화학연구소에서 미국 국립 암연구소(NCI)로부터 분양받아 사용하였다. 세포 배양은 RPMI 1640(Gibco)배지에 10% FBS (Fetal bovine serum, Gibco)와 항생물질(Antibiotic-

Antimycotic solution, 100× : 10 ml/L, Sigma)을 1% 농도로 사용하였다. 각 세포주는 5% CO₂를 유지시킨 37°C 항온항습기에서 배양시키다가 이것을 PBS (phosphate buffered saline, Gibco)로 두 번 세척한 후 trypsin-EDTA solution(0.25%, Gibco)과 D-PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Gibco)를 사용하여 세포를 분리수집해서 계대 배양하였다.¹⁹⁾

세포독성능 측정 - 표준항암제는 일동제약 제품인 adriamycin 10 mg을 D-PBS 1 ml에 용해시킨 다음 membrane filter(pore size: 0.22 μm)로 균체를 제거한 뒤 -20~-70°C 냉각고에서 보관하면서 실험직전에 D-PBS로 각각의 농도로 희석하여 사용하였다. 세포독성능 시험은 MTT법으로 실시하였다.²⁰⁾

세포부유액을 0.4% trypan blue solution(Gibco)으로 염색하여 hematocytometer 위에서 세포의 생존을 확인한 후 세포를 계수기로 세어 96 well plate에 L1210 세포와 P388D₁(2.5×10⁴/well) 세포 및 Vero (1.0×10⁴/well) 세포를 희석하여 well 당 180 μl씩 분주한 후 membrane filter(pore size: 0.22 μm, Gelma science)로 멸균된 방선균 배양여액을 column을 통과시켜 fraction한 시료를 8배 또는 12배 연속 희석한 것을 각 well에 20 μl씩을 첨가하였다. 72시간이 지난 후 각각의 well 판에 50 μl씩 D-PBS(pH 7.3)에 녹인 MTT용액(2 mg/ml, Sigma)을 가하고 4시간 동안 5% CO₂ incubator에서 37°C로 유지시켜서 배양하였다. 4시간 배양시킨 후에 1500 rpm에서 10분 동안 원심분리시켜 세포를 침전시킨 후 multichannel pipette(Flow Labs., Titertek)으로 배양액을 제거하고, DMSO(99.5%, Merk)를 150 μl씩 각각의 well에 첨가했다. 다음 생성된 적자색의 formazan을 잘 용해시키기 위해서 vortex로 5분 정도 well 판을 흔들어 주고 Alley 등이²¹⁾ 보고한 바에 따라서 ELISA reader(BIO-RAD model 450)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 기록하였다. 각각의 시료들은 농도마다 3개의 well을 평균 흡광도치를 결과로 계산하였으며 모든 실험은 3회에 시행하여 그 평균치를 사용하였다. 생존율의 값을 다음의 공식을 사용하여 측정하였다.

$$\text{생존율 (\%)} = \frac{\text{실험군의 평균 흡광도} - \text{기준흡광도}}{\text{대조군의 평균 흡광도} - \text{기준흡광도}} \times 100$$

IC₅₀값의 계산은 처리한 약물의 약물의 농도의 자연 대수값을 취하여 X축으로 설정하고 Y축은 각 well의

흡광도에서 환산된 생존율로 설정하여 생존율이 50%가 인접되는 well을 중심으로 이들 두 변수의 a, b값을 이용해 회기 방정식을 만든 후에 Y값에 50을 대입하여 IC₅₀값을 구하였다.

급성독성시험 - 분리균주 배양여액으로부터 정제과정을 통해 얻어진 분획에 대한(*in vitro* 시험 결과 암세포주 L1210(lymphocytic leukemia, mouse) 및 P388D₁(lymphoid neoplasma, mouse)에 우수한 세포독성능(cytotoxicity)을 나타내는 정제물을 선정하여 사용하였으며, 대조물질은 생리식염수를 사용하였다.

시험동물은 청정구역에서 생산된 SPF(specific pathogen free)인 ICR계 5주령인 mouse를 암수구별하여 사용하였으며 1주일간의 순화사육 기간동안 증상 관찰 등을 통해 육안적 이상소견이 없는 정상적인 동물만을 플라스틱 평저 cage(280W×420L×170H mm)에 대패밥을 깔고 후 5마리씩을 넣어 사육하였고 암수 각각 5마리씩을 1군으로 구성하여 분리하였다. 약물의 투여용량은 예비시험결과를 토대로 하여 예상 반수치 사망(LD₅₀)을 추정판단해서 최고투여용량과 최저투여용량을 설정하고 적절한 공비(분리균주 409는 2.27)로 단계별 투여용량(mg/kg)을 결정하였으며, 약물의 투여는 주사기(27G)를 이용하여 mouse의 복강내(IP)에 1일 1회(10~20 ml/kg)투여하였으며 투여량은 투여직전 체중의 변화에 따라 산출하였다. 대조군에는 생리식염수를 투여하여 7일까지 관찰하였다.

실험결과

방선균 분리주의 성상 - 분리균주 409는 배지에서 전형적인 *streptomyces* sp.의 mycelia와 spore를 형성하였다. 원형의 집락을 형성하며 기질균사(substrate mycelium)의 색깔은 노란색이었고 그 위로 회색의 기중균사(aerial mycelium)를 형성하였다. 주사전자현미경(scanning electron microscope) 관찰결과 포자의 형태가 타원형에 가까운 원통형으로 표면은 특이적인 돌출물을 갖고 있지 않는 매끈한 형태이고 포자사슬은 분절된 상태였으며 포자사슬의 형태는 나선형이었다. 여러 배지에서 배양하여 보았을 때 Sabouraud dextrose agar 및 Czapeck Dox agar를 제외한 대부분의 배지에서 잘 자랐으며 성장할 때 어떠한 특징적인 변화는 관찰할 수 없었고 light gray의 기중 균사와 노란색의 기중균사를 형성하며 가용성 색소는 노란색이었다

Table I – Cultural characteristics of the strain 409 on the different media

Medium	Growth	Aerial mycelium	Color of aerial mycelium	Reserve color	Soluble pigment
Nutrient agar	Good	Good	Light gray	Yellow	Yellow
Benett's agar	Good	Good	Gray	Deep brown	Brown
Yeast extract malt extract agar (ISP medium No.2)	Good	Good	Gray	Brownish gray	Brown
Oatmeal agar (ISP medium No.3)	Good	Good	Gray	Brownish gray	Deep brown
Inorganic salt starch agar (ISP medium No.4)	Good	Good	Gray	Yellow	Yellow
Glycerol-asparagine agar (ISP medium No.5)	Good	Good	Light Gray	Brownish gray	Brown
Peptone-yeast extract iron agar (ISP medium No.6)	Good	Poor	Light Gray	Brownish gray	Brown
Tyrosine agar (ISP medium No.7)	Good	Good	Gray	Brown	None
Sabouraud dextroseagar	Poor	None	None	Yellow	Yellow
Czapek Dox agar	Poor	Poor	Light Gray	Gray	None

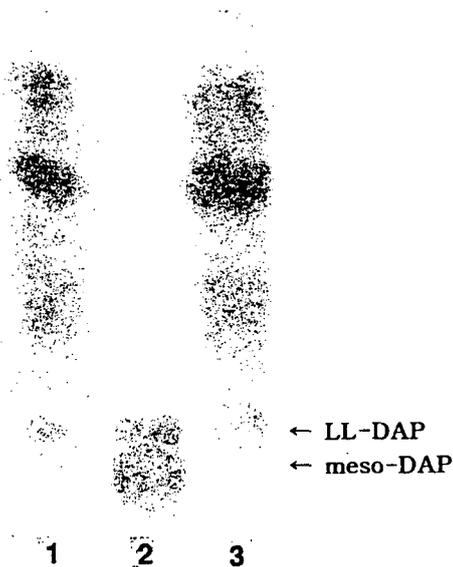


Fig. 2 – TLC of DAP(diaminopimelic acid) from the strain 409. 1. *Streptomyces viridochromogenes*, 2. Standard DAP (diaminopimelic acid), 3. Strain 409

(Table I).

화학분류학적 특성에 있어서 세포벽의 DAP 이성질체는 LL-DAP(diaminopimelic acid)를 갖고 있었다 (Fig. 2). 전균체 가수분해액에 대한 특이적 9종의 당에 대한 실험결과 세포내의 특징적인 당은 관찰되지 않았다(Fig. 3). 한편 인지질 구성성분에 대한 분석결과 *Streptomyces* sp. 분류에 이용되는 PE(phosphatidylethanolamine)를 포함하였으며 PI(phosphatidylinositol), DPG(diphosphatidylglycerol) 등을 포함하였다. 이러한 형태는 인지질의 구성성분에 따른 Lechevalier의 분류에서 phospholipid type PII의 형태이다. 지방

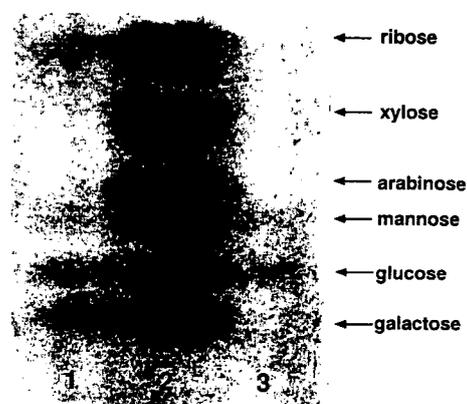


Fig. 3 – TLC of sugar from the strain 409. 1. *Streptomyces viridochromogenes*, 2. Standard (galactose, glucose, mannose, arabinose, xylose, ribose), 3. Strain 409

산 분석결과 *Streptomyces* sp.의 전형적인 주요 지방산 구성성분인 anteiso-15:0, iso-16:0 등이 존재하였다. 위와 같이 형태학적 특성과 화학분류학적 특성을 고려해 볼 때 분리균주 409는 다른 Actinomycete 속 중에서 *Streptomyces* 속에 속하는 것을 분류할 수 있다(Table II, III).

Taxon program을 이용한 종(species) 수리동정 – 종 수준의 동정을 위하여 실시한 분리균주 409의 50개 taxonomical unit characters에 대한 실험 결과를 Table IV에 나타내었다. 분리균주 409는 inorganic salt-starch agar(ISP medium 4)에서 배양 관찰시 spore morphology는 나선형이었고 melanin production은 peptone yeast extract iron agar(ISP medium 6), tyrosine agar(ISP medium 7) 모두에서 생성하지 못했다. 항균력 실험 결과, 대상균주에 대해 모두 음성

Table II – Biochemical markers of Streptomycetaceae and some other Actinomycete producing an aerial mycelium

Family and genus	Diaminopimelic acid	Peptidoglycan	Sugar	Phospholipid	Mycolic acids	Fatty acid
<i>Streptomycetaceae</i>						
<i>Streptomeces</i>	LL	A3 γ	-	PII	-	2c
<i>Streptovercillium</i>	LL	A3 γ	-	PII	-	2c
<i>Nocardia</i>	meso	A3 γ	A	PII	-	1b
<i>Nocardioides</i>	LL	A3 γ	-	PI	-	3c
<i>Pseudonocardia</i>	meso	A3 γ	A	PIII	-	2f
<i>Saccharomonospora</i>	meso	A3 γ	A	PII	-	2a
<i>Actinomadura</i>	meso	A3 γ	B	PI	-	3a
<i>Kitasatosporia</i>	LL/meso	ND	C	PII	-	2c

Table III – Chemotaxonomic characteristics of the strain 409

Characteristics	Strain 409
Cell wall type	I
DAP	LL-DAP
Sugar	None
Phospholipid type	PII
Major Fatty acid	ante-15:0 iso-16:0

결과를 보였고, 생화학적 특성을 알아보기 위한 실험에서는, lecithinase, lipolysis 등을 포함하는 모든 실험에서 양성 결과를 나타냈다. 분해능 실험결과, elastin, xanthine 및 arbutin을 모두 분해할 수 있었으며 항생제에 대한 감수성 실험결과, neomycin과 penicillin G에 민감성을 보였으며 나머지 oleomycin과 rifampicin에 대해서는 저항성을 나타냈다. 온도 및 화학제에 대한 성장실험 결과, 45°C에서는 성장이 억제

Table IV – Taxonomic unit characters of the strain 409

1. Morphology and pigmentation			
spore chain morphology	:	reflexible(-), spiral(+)	
color of spore mass	:	red(-), gray(+)	
mycelial pigment	:	red/orange(-)	
diffusible pigment	:	production(+), yellow/brown(+)	
melanin production	:	PYI medium(-), tyrosin medium(-)	
2. Antimicrobial activity			
<i>Bacillus subtilis</i> (SUB)	:	-	<i>Micrococcus luteus</i> (LUT) : -
<i>Candida albicans</i> (ALB)	:	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CER) : -
<i>Streptomyces murinus</i> (MUR)	:	-	<i>Aspergillus niger</i> (NIG) : -
3. Biochemical tests			
lecithinase (LEC)	:	+	lipolysis (LIP) : +
pectin hydrolysis (PEC)	:	+	nitrate reduction (NO ₃) : +
H ₂ S production	:	+	hippurate hydrolysis (HIP) : +
4. Degradative tests			
elastin (ELA)	:	+	xanthine (XAN) : +
albutin (ARB)	:	+	
5. Antibiotic resistance			
neomycin (NEO)	:	-	rifampicin (RIF) : +
oleandomycin (OLE)	:	+	penicillin G (PEN) : -
6. Growth tests			
45 (45)	:	-	NaCl (7Na) : -
sodium, azide (OLZ)	:	-	phenol (PHN) : -
potassium tellurite (OIT)	:	-	thallous acetate (TOI) : -

Table IV - Continued

7. Compounds as sole source of nitrogen (0.1%, w/v)			
DL-amino-n-butyric acid(BUT)	: +	L-cystein (CYS)	: +
L-valine (VAL)	: +	L-phenylalanine (PHE)	: -
L-histidine (HIS)	: +	L-hydroxyproline (HYD)	: -
8. Organic compounds as sole source of carbon (1%, w/v)			
sucrose (SUC)	: -	myo-inositol (INO)	: -
mannitol (MAN)	: -	L-rhamnose (RHA)	: -
raffinose (RAF)	: -	D-melezitose (MEZ)	: -
adonitol (ADO)	: -	dextran (DEX)	: -
D-melibiosi (MEB)	: +	xylitol (XYT)	: -

되었으며, NaCl(7%), phenol(0.1%)을 포함한 모든 화학제 존재하에서 성장억제효과를 보였다. 질소원 이용능 실험결과, DL- α -amino-n-butyric acid, L-cystine, L-valine 및 L-histidine 존재하에서 성장하였으며 L-phenylalanine과 L-hydroxyproline 존재시 성장하지 못하였다. 당 이용능을 실험한 결과 D-melibiose를 제외한 모든 당을 유일한 탄소원으로 이용할 수 없었다. 이러한 실험결과들을 기본으로 하여 분리균주 409의 단위특성을 양성(+) 혹은 음성(-)으로 입력한 후, 수리 분류하도록 작성한 Taxon program을 이용하여 수리 동정을 실시하였다.

본 분리균주 409의 단위 형질의 특성은 hypothetical median organism(HMO), cenotype인 *Streptomyces roseolus*, 가장 유사한 균주(best match strain) *Streptomyces hydrogenans*와 outer-most strain인 *Streptomyces umbrinus*의 Taxon unit character와 Willcox probability를 비교분석한 결과 분리균주 409는 *Streptomyces hydrogenans* ISP 5586과 가장 유사한 균주로 보인다.

종양세포에 대한 독성 - 분리균주 409번의 배양여액을 ethyl acetate로 추출 후 감압 농축하여 얻은 crude extract를 silica gel column chromatography를 이용하여 chloroform으로 전개시켜 일차적으로 세가지 분획, 즉 P1과 P2 그리고 P3을 얻었고 이 분획물들에 대한 세포 독성능 측정을 위해 각각 10 mg/ml의 농도로 맞춘 다음 10⁻¹에서 10⁻¹²의 농도까지 단계별로 희석하여 MTT assay를 실시하였다. 그 결과, 암세포주에 대해서 부분정제물인 P1이 나머지 P2, P3에 비해 높은 세포독성능을 보였다(Figs. 4 & 5, Table V).

P1으로부터 높은 순도의 항종양 물질을 분리하기 위

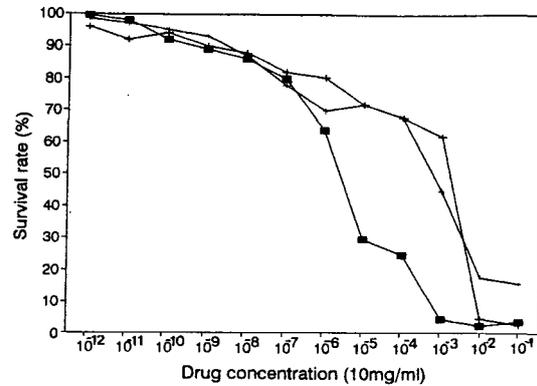


Fig. 4 - The survival rate of P388D1 following continuous exposure to partially purified P1, P2 and P3 measured by MTT assay. ■, P1; +, P2; *, P3

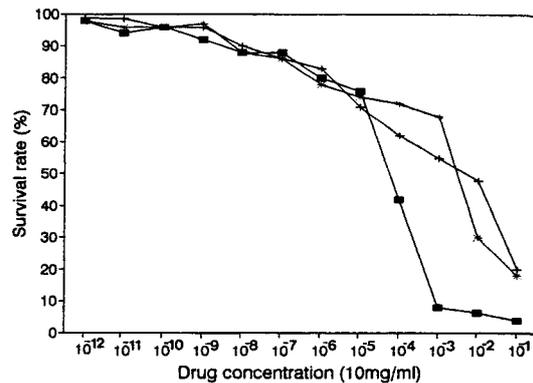


Fig. 5 - The survival rate of L1210 following continuous exposure to partially purified P1, P2 and P3 measured by MTT assay. ■, P1; +, P2; *, P3

해서 다른 용매체계에 의한 silica gel column chromatography를 이용하여 Compound 1과 Compound 2를 각각 분리하였다. 이 화합물들에 대한 시험관내 세

Table V - IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) of partially purified P1, P2 and P3 on cell lines

Cell lines	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)*		
	P1	P2	P3
P388D ₁	0.05	28.94	8.04
L1210	0.79	74.28	52.63

*50% growth inhibitory concentration.

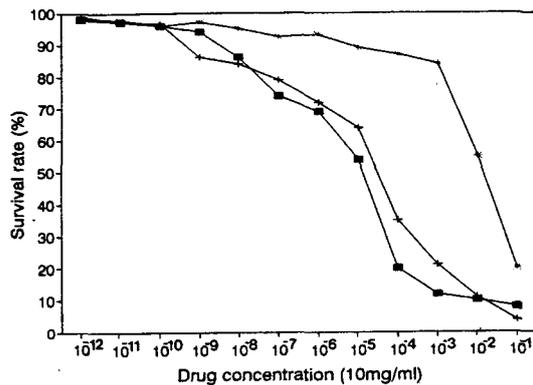


Fig. 6 - The survival rate of P388D₁, L1210 and Vero cells following continuous exposure to compound 1 measured by MTT assay. ■, P388D₁; +, L1210; *, Vero

포독성능을 같은 방법으로 측정한 결과, Compound 1의 IC_{50} 값은 양성 대조 세포주 Vero에 대해 228.57 $\mu\text{g/ml}$, 암세포주 P388D₁, L1210에 0.2 $\mu\text{g/ml}$, 0.53 $\mu\text{g/ml}$ 로 각각 측정되었다(Fig. 6). Compound 2의 세포 독성능 측정결과, P388D₁에 대한 IC_{50} 값이 43.75 $\mu\text{g/ml}$ 이었다(Fig. 7). Compound 1과 Compound 2의 세포독성능을 대조약물인 adriamycin과 비교해본 결과, Compound 1은 암세포주에 대해 adriamycin보다 약 4배 높은 세포독성능을 나타내었으며, L1210에 대해서는 비슷한 독성능을 갖는 것으로 측정되었다(Table VI). 이에 반해 Compound 2의 경우 P388D₁과 L1210 세포주 모두에 대해 대조약물보다 높은 IC_{50} 값을 갖는 것으로 나타났다(Table VI). 그리고 정상 세포주 Vero에 대한 정제물질들의 IC_{50} 값을 adriamycin과 비교시, Compound 2는 약간 높은 독성능(약 1.3 배)을 갖는 것으로 나타났다.

급성 독성 시험 - 정제물 Compound 1을 생쥐 복강 내에 투여하여 급성 독성시험을 한 결과, 4일째에 암 농이 최고용량 60 mg/kg과 26.4 mg/kg에서 1마리씩의 사망동물이 관찰되었고, 50 mg/kg에서 1마리의 사

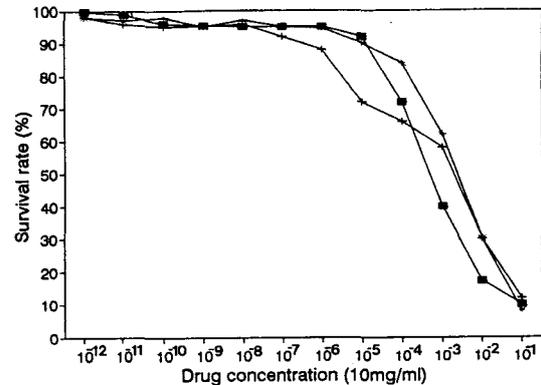


Fig. 7 - The survival rate of P388D₁, L1210 and Vero cells following continuous exposure to compound 2 measured by MTT assay. ■, P388D₁; +, L1210; *, Vero

Table VI - IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) of compounds 1, 2 and adriamycin on cell lines

Cell lines	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		
	Compound 1	Compound 2	ADM*
P388D ₁	0.20	7.18	0.88
L1210	0.53	35.71	0.54
Vero	228.57	43.75	57.69

ADM* : Adriamycin

망동물이 관찰되기 시작하였다. 대조군과 최저용량군 2.3 mg/kg에서는 사망한 동물이 없었다. 시험이 끝난 후의 총 사망 동물수는 암수 각각 최고 용량군으로부터 5마리, 3마리, 1마리, 1마리씩의 사망동물이 관찰되었으며 LD_{50} 값은 22.62 mg/kg, 95% confidence limit는 12.57-40.72 mg/kg이었다(Table VII).

고 찰

암의 예방과 그 치료법 개발을 위한 연구가 국내외에서 활발히 진행되고 있어 실제 다양한 항암제가 개발되어 임상에서 사용되고 있으나 결정적인 효과를 보이는 약물을 발견하지 못하고 있는 실정이다. 지금까지 임상에서 사용되는 항암 화학요법제로는 알킬화제, 대사 길항물질, 항생물질 등이다. 이들은 대부분 그 부작용이 강하고 인체 면역 체계에 중요한 역할을 갖는 lymph 세포, 골수 세포 등을 종양 세포보다 훨씬 강하게 파괴시켜 체내 암 뿐만 아니라 다른 감염증에 대한 저항력까지 약하게 하여²⁸⁾ 임상적 반응에 심각한

Table VII – Mortality of mice were intraperitoneally injected with compound 1

Sex	Dosage (mg/kg)	Number	Days after treatment							Final Mortality
			1	2	3	4	5	6	7	
Male	60	5				1	1	1	2	5/5
	26.4	5						2	1	3/5
	11.6	5						1		1/5
	5.1	5							1	1/5
	2.3	5								0/5
	0	5								0/5
Female	60	5				1		2	2	5/5
	26.4	5				1	1		1	3/5
	11.6	5						1		1/5
	5.1	5						1		1/5
	2.3	5								0/5
	0	5								0/5

문제가 되고 있다. 이러한 합성 약품의 부작용과 독성에 대한 보고가 계속됨에 따라 전세계적으로 천연물로부터 신약을 창출하려는 시도가 공통된 연구 추세라 할 수 있다. 그 이유는 새로운 약물 작용 및 화학구조를 갖는 화합물과 독성 및 부작용이 적은 신물질이 합성 화합물보다는 천연물에서 발견될 가능성과 확률이 매우 높기 때문이다.

방선균(Actinomycetes)에 속하는 방선균(Streptomyces)은 토양 내에 존재하는 호기성 균주로서 생물학적 활성이 있는 2차 대사산물을 분비하는 균주로 알려져 있다. 그리고 실제 매년 200내지 300종의 항생물질과 항바이러스 항암물질을 포함하는 새로운 활성 물질이 보고되고 있으며 그 중 약 100정도가 방선균으로부터 분리되는 것이다.²²⁾ 이에 본 실험에서는 국내에서 채취된 토양 sample로부터 순수분리된 방선균 주들을 대상으로 먼저 그 배양액에 대한 *in vitro* 세포독성능²³⁾을 측정하였으며, 그 결과 분리균주 409가 특히 암세포주에 효과적인 독성능을 보임에 이로부터 항종양 물질을 분리하고 평가하였다.

먼저, 항종양능을 보이는 화합물의 순수분리를 위해 분리균주 409의 대량배양액을 유기용매 ethyl acetate로 일차 추출하여 얻어진 crude extract로부터 silicagel column chromatography를 이용하여 부분 정제물질인 P1, P2 그리고 P3를 얻었다. 이 세 가지 분획물 중 항종양능을 보이는 분획을 추적하기 위해 MTT assay를 이용하여 시험관내 세포독성능을 알아 보았다. 이 방법은 MTT([3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-dimethyl tetrazolium bromide])가 환원되어

청색의 formazan 결정이 생성되는데 여기에 용해제를 넣고 분광분석기로 흡광도를 재어 간접적으로 살아있는 세포수를 측정하는 방법이다. 이 방법을 통해 세포 독성, 세포증식 및 세포의 활성화 등을 측정할 수 있으며, 신속하고 정확한 반자동적 방법으로 동시에 검출할 수 있는 장점을 가지고 있어 미국의 국립 암연구소에서 항암제 screening에 채택되고 있다.¹⁹⁾ 따라서 새로운 항종양 화합물을 찾고자 하는 본 실험의 목적상 이 방법이 적합하다고 판단하여 분리된 물질의 세포 독성능 측정에 적용하였다. 또한 MTT assay를 이용한 세포 독성능 측정에 있어서 중요한 점은 formazan 형성률이 각 세포주마다 다르기 때문에 각 세포주에서 세포수에 대한 흡광도의 교정곡선이 필요한 것으로 보고되어 있다.²⁴⁾ 세포수가 높은 상태에서 MTT가 완전히 환원되거나 세포가 과밀집된 well에서는 대사가 감소되어 흡광도와의 정체를 볼 수 있으며²⁵⁾ 이런 이유로 세포가 지속적 성장에 있을 때 정확한 생존율을 계산하여 각 세포주에 따라 적절한 표적세포를 결정하는 것이 매우 중요한 것으로 알려져 있다.²⁶⁾

본 실험에 사용된 세포주는 모두 세 가지로, P388D₁, L1210과 Vero 세포주이다. P388D₁과 L1210은 mouse leukemia 세포주이며 대조 세포로 정상세포주인 Vero 세포주를 사용하였고, MTT 측정을 위한 적절한 세포 농도는 P388D₁과 L1210은 2.5×10^4 cells/well, Vero는 1.0×10^5 cells/well로 결정되었다. 실험결과, P1이 나머지 두 부분정제물에 비해 높은 암세포 살해능을 보여 다시 P1에 대해 재차 chromatography를 실시하

여 최종적으로 정제된 두 가지 화합물을 획득할 수 있었고 각 정제 화합물에 대한 세포 독성능을 측정하여 보았다.

Compound 1은 암세포주 P388D₁에 대해 대조약물인 adriamycin보다 약 4배 정도 더 높은 세포독성능을 나타내었으며 특히 정상세포주 Vero에 대해서는 그 독성능이 대조약물보다 낮게 측정되었다(약 1.4배). 또한 암세포주와 정상세포주에 대한 MTT assay 결과로부터 두 암세포주 P388D₁과 L1210에 대해서 정상세포주인 Vero보다 약 600배 정도의 높은 상대적인 선택 독성능을 나타냈다.

Compound 2의 경우 그 IC₅₀값을 adriamycin과 비교시, 정상세포주에 대해서는 더 낮게 측정되어 결과적으로 더 높은 세포 살해능을 보였으며 암세포주에 대한 유의성 있는 상대적인 선택 독성능을 관찰할 수 있었다. 따라서 Compound 2는 항종양능이 없거나 약하고 이에 반해 상대적으로 독성이 높은 물질로 판단되었다.

위의 시험관내 세포 독성능 결과로부터 Compound 1을 생물학적 활성 시험을 위한 시료로 선택하여 그 안정성을 생체 내에서 평가해 보고자 mouse 급성독성 시험을 시행하여 보았다. 생쥐를 이용한 급성독성시험 결과 치사독성능이 높은 것으로 나타나 신규 항종양물질 후보로는 적합치 않을 수도 있으나 상용 안정성 시험결과에서는 유의성이 있는 임상증상이 발견되지 않았고 체중 측정결과, 대조군에 비해 별다른 체중변화도 나타나지 않았다(Data not shown). 동물실험을 통한 약리학적 연구 결과는 동물의 종류에 따라 반응의 차이가 날 수도 있고 인체 내에서의 약물대사과정이 다르기 때문에 반응의 차이가 날 수도 있다는 사실을 고려할 때, 극히 미량의 Compound 1을 적절하게 사용하면 약효만을 낼 수 있으리라 사료되며, 신규 항종양물질로서 그 가능성에 대해 좀 더 정확한 판단을 위해 미국 국립 암연구소에서 권장하는 tumor panel system에^{19,27)} 의거한 생체내 항암활성능(antitumor activity)을 측정해 보는 것이 차후 시급한 과제라 하겠다. 한편 생산균주 409로부터 Compound 1을 기존의 항암제와 면밀히 비교분석하여 그 화학구조의 신규 성과 mouse내 항암활성의 탁월함이 입증될 경우, 인간의 다양한 종양세포주를 이용하여 *in vitro* 세포 독성능 측정 및 누드 마우스 등의 *in vivo* 항암활성을 측정하여 임상에서 활용될 수 있는 가능성에 대해 추

구함이 필요한 것으로 생각된다.

결 론

국내 토양에서 항종양물질을 생산하는 방선균을 분리하여 그 배양여액으로부터 화합물을 정제하였고 그 정제물의 *in vitro* 세포 독성능 및 mouse 급성 독성 시험, 상용안정성 시험을 통해서 항암활성을 관찰하였으며 생산균주를 ISP 분류 기준에 의거한 동정을 시도하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 분리균주 409의 배양여액으로부터 항종양능을 보이는 두 가지 화합물, Compound 1과 Compound 2를 분리 정제하였다. *in vitro* 세포독성능을 측정하여 그 IC₅₀값을 비교해 본 결과, 암세포주 P388D₁과 L1210에 대해 Compound 1은 0.2 µg/ml, 0.53 µg/ml로 그리고 Compound 2는 7.18 µg/ml, 35.71 µg/ml로 각각 측정되었다. 대조약물인 adriamycin의 세포독성능과 비교해보면, Compound 1은 P388D₁에 약 4.5배 정도 높은 독성능을 보였으며 정상세포인 Vero에 대해서는 그 IC₅₀값이 228.57 µg/ml로서 adriamycin보다 약 1/4배까지 낮은 독성능을 보였다. mouse 급성독성시험 결과 LD₅₀값은 22.62 mg/kg이었다. 상용 안전성 시험결과 시험물질 투여 후 1일째에 2마리의 시험동물이 입모 현상을 보였으며 그 중 한 마리는 2일째에 회복을 하였고, 나머지 한 마리는 3일째에 회복하였다. 그 외의 뚜렷한 임상증상은 관찰되지 않았으며 대조군과 비교하여 유의성 있는 체중감소는 없었다. 따라서 compound 1은 항종양물질로서의 개발 가능성을 제시할 수 있다.

문 헌

- 1) Hanka, L. J., Martin, D. G. and Neil, G. L. : A multi-end point *in vitro* system for detection of new antitumor drugs. *Antibiot. Chemother.* **23**, 26 (1978).
- 2) Hanka, L. J., Martin, D. G. and Neil, G. L. : *In vitro* methods used in detection and quantitation of antitumor drugs produced by microbial fermentations. *J. Nat. Prod.* **41**, 85 (1978).
- 3) Umezawa, H. : New antibiotics, bleomycin A and B. *J. antibiotics* **19**, 2000 (1966).
- 4) Williams, S. T., Holt, J.G. and Sharpe, M. E. : *Bergey's manual of systemtic bacteriology.* **4**, 2351 (1982).

- 5) Shirling, E. B. and Gottlieb, K. : Methods for characterization of streptomyces species(1). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **18**, 69, **16**, 313 (1966).
- 6) Shirling, E. B. and Gottlieb, K. : Methods for characterization of streptomyces species(2). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **22**, 265 (1966).
- 7) Starr, M. P., Stollp, H. and Truper, H. G. : The procaryotes. **2**, 2058 (1992).
- 8) Gasparic, J. and Churacek, J. : *Laboratory handbook of paper and thin-layer chromatography*. John Willey & Sons. R.A. Chalmers(ed.). 10 (1978).
- 9) Gasparic, J. and Churacek, J. : *Laboratory handbook of paper and thin-layer chromatography*. John Willey & Sons. 300 (1978).
- 10) Stanek, J. I. and Roberts, G. D. : Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* **119**, 226 (1974).
- 11) Lechevalier, M. P., Bievr, C. D. and Lechevalier, H. A. : Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes, Phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.* **5**, 249 (1977).
- 12) Lechevalier, H. A. and Lechevalier, M. P. : *The chemotaxonomy of actinomycetes*. special publication 6th ed., Arlington. p.227 (1980).
- 13) Goodfellow, M. and Minnikin, D. E. : *Introduction to chemosystematics*. In *chemical methods in Bacterial systematics*. Academic press, London. p. 1 (1985).
- 14) Williams, S. T. : A probability matrix for identification of some Streptomyces. *J. Gen* **129**, 1815 (1983).
- 15) Nitsch, B. and Kutzner, H. J. : Egg-yolk agar as a diagnostic medium for Streptomyces. *Experientia* **25**, 113 (1969).
- 16) Hankin, L., Zucker, M. and Sands, D. C. : Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. *Appl. Microbiol.* **22**, 205 (1971).
- 17) Kuster, E. and Williams, S. T. : Production of hydrogen sulphide by streptomycetes and methods for its detection. *Appl. Microbiol.* **12**, 46 (1964).
- 18) Tachibana, A. K., Ohtani, M., Komiya, S., Naito, C. and Yano, K. : Talampicillin hydrochloride : Comparison with amoxicillin and ampicillin in the antibacterial activity and pharmacokinetics. *J. Antibiotics* **166**, 34 (1978).
- 19) Alley, C. M. : Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**, 589 (1988).
- 20) Freshney, R. I. : *Culture of animal cells a manual of basic technique*. 3rd ed., p. 287 (1994).
- 21) Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J. and Berdy, J. : *In bioactive metabolites from microorganisms*. Elsevier. (1989).
- 22) Lancini, C. : Screening for new antibiotics. Lecture, Int. School of General Genetics : Microbial breeding . Erice, Italy. (1980).
- 23) Mossman, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* **65**, 55 (1983).
- 24) Patricia, P. and McMillan, T. J. : Use of the tetrazolium assay in measuring the response of human tumor cells to ionizing radiation. *Cancer Res.* **50**, 1392 (1990).
- 25) Green, L. M., Reade, J. L. and Ware, V. F. : Rapid colorimetric assay for cell viability Application to the Quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods* **70**, 257 (1984).
- 26) Ruben, R. L. : Semiautomated colorimetric assay for in vitro screening of antitumor compounds. *Cancer Treat. Rep.* **71**, 1141 (1987).
- 27) Czerwinski, M. J., Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A. and Boyd, M. R. : Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**, 589 (1988).